FACULTE DE MEDECINE
PITIE-SALPETRIERE
UNIVERSITE PARIS VI

ANNEE 1973

THESE

N° 156

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Jean-François GODEAU
Né le 15 janvier 1944 à PARIS

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE. . . . . .

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES VARIATIONS GENETIQUEMENT DETERMINEES DE LA SERUM-ALBUMINE HUMAINE

Président : M. J. ROSA, Professeur

EDITIONS MEDICALES EM ET UNIVERSITAIRES
40, rue Pascal - PARIS XIIIe

FACULTE DE MEDECINE
PITIE-SALPETRIERE
UNIVERSITE PARIS VI

ANNEE
1973

THESE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Jean-François GODEAU
Né le 15 janvier 1944 à PARIS

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE. . . . . .

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES VARIATIONS GENETIQUEMENT DETERMINEES DE LA SERUM-ALBUMINE HUMAINE

Président : M. J. ROSA, Professeur

EDITIONS MEDICALES EM ET UNIVERSITAIRES
40, rue Pascal - PARIS XIIIe

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes Parents

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544721_0010

Au Professeur J. ROSA qui m'a donné le goût et les moyens de réaliser ce travail.

PLAN

- INTRODUCTION
  - Généralités sur les variations génétiquement transmises des protéines plasmatiques,
  - Mécanismes de mutation - Effets sur la structure des protéines
  - Principaux variants connus des protéines du plasma.

- ALBUMINE
  - Propriétés chimiques et physiques
  - Structure tridimensionnelle
  - Propriétés biologiques à ligands
  - Relations structure-fonction

- HETEROGENEITE PHYSICO-CHIMIQUE
  - I - Macro-hétérogénéité
  - II - Micro-hétérogénéité
  - III - Cas du vieillissement lors de la conservation

- HETEROGENEITE GENETIQUE
  - I - Bisalbuminémies vraies
    - Fausses bis albuminémies
    - Etude structurale d'une bis albuminémie
  - II - Autre type de variant génétiquement transmis - Dimère d'albumine
  - III - Analbuminémie
  - IV - Implications génétiques : liaison entre le locus albumine et le locus de la Gc protéine

- CONCLUSION

INTRODUCTION

GENERALITES SUR LES VARIATIONS

GENETIQUEMENT TRANSMISES DES PROTEINES PLASMATIQUES

L'étude des protéines plasmatiques a rendu clairement perceptible la diversité génétique de l'homme.

Les altérations de la structure chimique de ces protéines ont pu, en effet, être mises en évidence. On a, jusqu'à ce jour, décrit une centaine de variations affectant les protéines du sérum humain. Certaines sont rencontrées dans une population comme des mutants rares, d'autres sont présentes comme des phénotypes plus fréquents.

Ce sont les méthodes électrophorétiques et immunologiques et, notamment celles qui utilisent comme support les gels d'amidon ou de polyacrylamide, qui ont jusqu'à présent permis la découverte et l'étude de ces mutants.

L'emploi de cette méthodologie a ainsi mis en évidence que les substitutions d'amino acides conférent soit une différence de charge par rapport à la protéine "sauvage", soit une modification des propriétés antigéniques.

Les nombreuses substitutions d'amino acides ne modifiant ni la mobilité électrophorétique ni l'antigénicité sont restées muettes face à ces méthodes. Il est clair que celles-ci n'en peuvent pas moins être responsables de changement de propriété et/ou de conformation d'intérêt capital.

oOo

Les variations génétiquement transmises décrites jusqu'ici intéressent :

- la préalbumine,
- l'albumine
- l'alpha 1-antitrypsine
- l'alpha 1-glycoprotéine acide
- la Gc protéine
- l'haptoglobine
- la bêta lipoprotéine
- la transférine
- le complément
- les immunoglobulines.

ooo

IMPLICATIONS GENETIQUES DE CES VARIATIONS

La transmission du caractère muté suit les lois générales de l'hérédité et les gènes se maintiennent avec une constante fréquence à travers un nombre illimité de générations d'une population, sauf si la pression de sélection opère dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution de leur nombre.

Dans le cas des protéines plasmatiques, il est difficile de trouver des exemples mettant en évidence l'action de la sélection sur la séquence de la chaîne polypeptidique.

Le meilleur exemple est celui de l'haptoglobine avec son type 2-2 qui a un pouvoir de fixation de l'hémoglobine plus grand que les autres types ce qui explique une distribution anormale de ce gène dans la population mondiale.

oOo

RAPPEL DES PRINCIPES DE COLINEARITE DU GENE ET DE LA STRUCTURE PROTEIQUE

La séquence du DNA contenant l'information génétique déterminant la structure d'une chaîne polypeptidique est appelée un cistron.

Chaque cistron est composé de plusieurs codons. Un codon est un triplet de 3 bases de 3 nucléolides qui code pour un acide aminé spécifique.

Les groupes de cistrons qui font partie d'un ensemble fonctionnel sont situés séquentiellement sur le chromosome et fournissent un moule sur lequel les RNA messagers peuvent être assemblés par un processus enzymatique.

Un couplage spécifique des bases du DNA et du m-RNA permet au messager de contenir la même information que le DNA dont il est issu. Le RNA ainsi formé passe dans le cytoplasme où il est étroitement associé aux polysomes qui sont des ensembles de ribosomes. Le long de la structure ribosomale chaque protéine est synthétisée dans un ordre spécifique déterminé par la séquence des codons du DNA, les acides aminés sont prélevés selon cet ordre dans le cytoplasme par les ARN de transfert spécifiques de chaque amino-acide. Les codons du mRNA s'associent complémentairement avec ceux du t RNA de telle sorte que la séquence en amino-acides est dictée par la séquence des triplets du cistron.

La synthèse d'une chaîne polypeptidique commence séquentiellement par l'acide aminé N terminal et lorsque la séquence est parvenue à l'acide aminé C terminal la chaîne polypeptidique se détache du ribosome. Il a été établi que les mutations affectant un seul amino acide résultent d'une simple substitution de base dans le DNA.

Il existe des mutants chez le bactériophage chez lesquels l'altération à l'intérieur d'un triplet aboutit à la constitution d'un codon non sens. Le fait que ce codon non sens soit incapable d'être transcrit en l'un quelconque des acides aminés induit la fin de la lecture du messager par les ribosomes, et le polypeptide n'est plus synthétisé distalement par rapport à cette mutation.

Lorsque ce mutant est mis en culture dans un hôte bactérien susceptible de "supprimer" ce phénotype du phage porteur d'une mutation, le système redevient apte à synthétiser l'ensemble de la chaîne polypeptique et le codon non sens est alors toujours lu comme un amino-acide par le ribosome. La carte génétique pour une classe de mutations suppressibles affectant la protéine de la tête du bactériophage T4 a été dressée. Un nombre variable de fragments de la chaîne polypeptidique était produit par chatype de mutants. En confrontant le site du gène muté et le fragment polypeptidique produit par chaque mutant, on a montré que l'ordre et le nombre des fragments polypeptidiques et celui des segments de DNA viral déterminés par l'analyse génétique des mutants étaient identiques.

Ceci fut un des arguments principaux apportés à l'appui de la théorie de la colinéarité du gène et de la structure protéique, dont l'élucidation définitive du code génétique a été une confirmation particulièrement éclatante.

En effet, on sait que l'on peut établir entre l'ensemble des 20 acides aminés trouvés dans les hydrolysats de protéines et l'ensemble des combinaisons prises 3 à 3 des différentes bases C_B des nucléotides du DNA

du génome (ou codon) une relation où l'on peut faire correspondre à chaque acide aminé un ou plusieurs codons.

Cette relation est dite "code génétique". Celui-ci est comme l'on sait dégénéré puisque un seul acide aminé peut être déterminé par plusieurs triplets de bases. Il est d'autre part universel puisqu'il a été établi qu'il était le même pour tous les organismes vivants étudiés depuis le bactériophage jusqu'aux mammifères supérieurs.

oOo

MECANISMES DE CONTROLE GENETIQUE

L'hypothèse de Jacob et Monod faite à partir de l'étude du contrôle de la synthèse de la beta galactosidase d'Escherichia Coli suppose à côté de l'existence du gène de structure celle d'un gène opérateur, cet ensemble s'appelant opéron. Ainsi la structure primaire des protéines est déterminée par un gène de structure lié à un opérateur sur le chromosome. La transcription du gène de structure par le cytoplasme dépend du gène opérateur situé à une extrémité de l'opéron, chacun des gènes opérateurs contrôlant les gènes de structure adjacents sur le chromosome. La synthèse de la protéine est initiée par l'opérateur pendant que le gène régulateur détermine la production d'un represseur protéique et qui inhibe l'activité de l'opérateur de telle sorte que la synthèse de la chaîne déterminée par le gène de structure diminue ou cesse.

Ce réprosseur allostérique a la propriété d'être inhibé par une substance chimique de nature variable qui est l'inducteur de la synthèse protéique.

oOo

EFFETS DES MUTATIONS SUR LA STRUCTURE DES PROTEINES

Les modifications génétiques qui peuvent intervenir dans la gène de structure d'une protéine sont de deux grands types : les mutations ponctuelles et les réarrangements chromosomiques. L'hémoglobine qui est la protéine humaine la mieux connue fournit un excellent modèle, qui permet de décrire chacun de ces types.

- Les mutations ponctuelles :

Après avoir développé la technique des finger prints, qui consiste à faire une carte des peptides résultants d'un hydrolysat trypsique de protéine, Ingram a pu identifier la substitution d'amino-acide survenant dans l'hémoglobine S de la "Sicle Cell Anemia" et montrer que l'altération de la structure primaire de la protéine ne résultait que d'une seule substitution d'amino acide.

Aujourd'hui plus d'une centaine de mutants d'hémoglobine ont été décrits en utilisant des techniques voisines et les substitutions d'amino acide propres à chacun d'eux mises en évidence et caractérisées. La substitution d'un amino-acide dans chacune de ces hémoglobines anormales résulte de l'altération d'au moins une des trois bases nucléotidiques du codon.

Au regard de l'évolution, seules les mutations de la structure primaire qui intéressent un segment essentiel de la molécule, ont une importance.

C'est ainsi que lorsqu'on étudie la séquence comparée d'une protéine dans plusieurs espèces animales, ce sont les fragments constants que l'on considère comme essentiels, c'est-à-dire ceux à l'intérieur desquels une

mutation entraîne une perturbation de la fonction telle qu'elle est éliminée par la sélection au lieu d'être éventuellement conservée.

Ainsi Margoliash a rapporté un fragment de séquence du cytochrome en invariant dans 7 espèces allant de la levure à l'homme. Bien qu'une fonction doive encore être attachée à cette séquence il paraît clair que ce segment est nécessaire au maintien soit de la fonction, soit de la structure tertiaire de cette protéine.

Epstein et Motulsky ont récemment discuté de l'importance quant à l'évolution de la conservation de la structure tertiaire des protéines du maintien ou non de la distribution des acides aminés polaires et non polaires.

Utilisant la classification de Kendrew en acides aminés polaires et non polaires, Epstein et Motulsky ont divisé les mutations conduisant à une substitution d'amino acides en trois groupes :

- substitutions permises : AA polaire/ AA polaire
- substitutions interdites : AA polaire / AA non polaire
- substitutions relativement permises : AA polaire/ Gly
  AA polaire / Ala

On rapporte que les substitutions interdites forment pour l'hémoglobine seulement 1/8 de l'ensemble des mutations décrites. La pression de solution a donc éliminé les "substitutions interdites" opérant un bouleversement de la structure tertiaire, et ce sont les mutations qui conservent la structure tertiaire de la protéine qui sont venues jusqu'à nous.

A côté de ces mutations ponctuelles nous devons envisager l'étude d'une autre forme de modification génétique.

- Réarrangements chromosomiques :

Ici encore c'est l'hémoglobine qui va fournir le modèle. Il existe pour cette protéine un mutant qui résulte d'un crossing-over "inégal" entre

2 loci voisins. Ce type d'aberration de la recombinaison était connu chez Drosophila Melanogaster et Escherichia Coli.

a) - Des analogies de séquence dans la structure primaire de 3 enzymes pancréatiques : le chymotrypsinogène A, le trypsine et l'élastase ont été observés à l'intérieur d'une même espèce. Dans l'espèce bovine 40 % de la séquence du trypsinogène et du chymotryosinogène sont communs. Pour interpréter ces faits, Hartley et al. ont suggéré que les gènes de structure contrôlant la séquence de ces enzymes dérivaient d'un ancêtre commun. Or, les substrats de ces deux enzymes sont très sensiblement différents. C'est donc que des altérations de structure ont, par ailleurs, été apportées modifiant notablement cette communauté d'origine.

b) - De même la similarité frappante qui existe entre les séquences des chaînes alpha, beta, gamma, delta de l'hémoglobine humaine a conduit Ingram à proposer une origine commune aux gènes qui déterminent la synthèse de ces chaînes. Ainsi les chaînes beta et delta ne diffèrent que par 10 aa et l'étude génétique des familles présentant une mutation à la fois sur la chaîne bête et sur la chaîne delta montrent une liaison étroite entre les deux. Une preuve supplémentaire de la proximité de ces gènes est donnée par le fait suivant :

On connaît une hémoglobine (hémoglobine Lepore) dont la séquence est identique à celle d'une chaîne delta de l'extrémité N terminale au peptide T XI et identique à celle d'une chaîne bêta du peptide T XII à l'extrémité C terminale. Elle résulte d'un crossing over inégal entre les loci beta et delta.

D'autres cas de réarrangements chromosomiques sont seulement probables. L'haptoglobine en est un. Le locus déterminant la synthèse de l'Hp 2-2 résulterait d'un réarrangement chromosomique de l'Hp 1-1 et serait fait d'une rupture suivie d'une réassociation du gène Hp 1. Cette hypothèse fondée sur le fait que l'Hp 2-2 a une masse moléculaire double de l'Hp 1-1 est confirmée par l'étude de la séquence de la chaîne de l'Hp 2-2.

- PRINCIPALES VARIATIONS GENETIQUEMENT TRANSMISES DES PROTEINES PLASMATIQUES

Les variations génétiquement transmises connues des protéines plasmatiques concernant 10 espèces moléculaires :

- le préalbumine,
- le sérum albumine,
- l'alpha$_1$ antitrypsine,
- l'alpha$_1$ glycoprotéine acide,
- la protéine Gc
- l'haptoglobine,
- les lipoprotéines,
- la transferrine
- le complément,
- les immunoglobulines.

Nous allons examiner succinctement les différentes variations affectant chacune de ces molécules, à l'aide du tableau suivant :

oOo

	Alpha 1 antitryps.	Lipo-protéines	Gc protéines	Immuno globul.	Hp	C'	Pré Alb	Tf
Dédoublement unique ou multiple	unique	+	Gc Y Gc X Gc Chippawi Gc aborigène	O	Unique sur les chaînes alpha:F,S	C_3 8 variants	3 variants	multiples lents rapides
Absence héréditaire	+	+	0	+	0	C_3,C_5	0	0
Polymorphisme immunologique génétiquement transmis	0	+	0	sur les chaînes lourdes et légères	0	0	0	0

Principales variations génétiquement transmises des protéines plasmatiques.

SERUM - ALBUMINE

PROPRIETES

La présence en grande quantité de cette protéine dans le sérum des mammifères a tôt permis la purification, l'isolement et la caractérisation de cette protéine. Toutefois, l'on peut s'étonner de n'avoir encore sur la structure primaire comme sur la structure tridimensionnelle de cette molécule que des données relativement indirectes et incomplètes. Bien sûr, les dimensions importantes, puisque faite de 611 aa, de cette chaîne polypeptidique unique en a prohibé, jusqu'à aujourd'hui, aussi bien l'étude cristallographique que celle de la séquence en amino-acides. L'on peut penser en voyant s'accélérer d'année en année le nombre de protéines dont la structure est élucidée qu'il en sera bientôt de même pour l'albumine.

De même, toute la lumière n'a pas été faite sur le rôle physiologique de cette protéine dont on sait, bien sûr, qu'elle assure, à côté d'un rôle de transport important de divers ions, métabolites ou hormones et d'un rôle de stockage de peptides ou d'acides aminés, un rôle de régulation du volume plasmatique qui lui est conféré par la place qu'elle occupe dans l'établissement et le maintien de la pression oncotique du plasma.

On ne peut toutefois manquer de s'étonner en constatant dans les cas d'analbuminémie héréditaire rapportés dans la littérature, la pauvreté, voire l'absence de troubles dont sont victimes les patients, porteurs de ce phénotype.

C'est donc peut être aussi l'absence d'un rôle physiologique unique précis et crucial qui a empêché que l'attention et les efforts des biochimistes

ne se focalisent sur l'élucidation de la structure de cette protéine, occupés qu'ils étaient d'étudier les relations structure-fonction sur les modèles plus simples et plus directement parlants.

I - COMPOSITION CHIMIQUE

Analyse d'acides aminés		Peptides trypsiques	
LYS	57	LYS + ARG	81
HIS	15		14
ARG	24		
CYS	35	SH-SH	17
TRY	1		
ASP	53		
THR	26		
SER	21		
GLU	81		
PRO	24		
GLY	14		
ALA	61		
VAL	41		
MET	9		
ILE	6		
LEU	59		
TYR	15		15
PHE	30		
	652		

De masse moléculaire 65. 000 ; la molécule est faite de 611 acides aminés. L'analyse ne montre aucun composant qui n'appartienne pas à la catégorie des acides aminés. Elle est en particulier dépourvue du groupement prosthétique.

Les acides gras et les métaux lourds, fortement liés ne semblent représenter que des contaminants et non pas de véritables constituants de la molécule.

Possédant un seul résidu C terminal, la LEU, et un seul N terminal : l'ASP, la molécule semble bien formée d'une seule chaîne polypeptidique. A côté de l'unicité des résidus C et N terminaux d'autres arguments plaident en faveur de la singularité de la chaîne polypeptidique.

1 - La réduction de la totalité des ponts disulfures ne fait pas apparaître de diminution de la masse moléculaire.

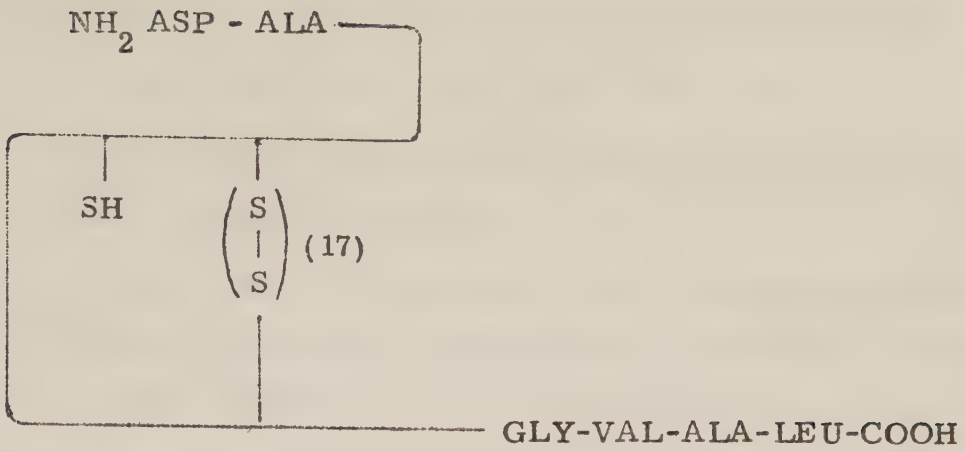
2 - De même, la comparaison sur des fingers prints d'hydrolysats trypsiques colorés spécifiquement pour plusieurs acides aminés montre le même nombre de spots prenant les colorations spécifiques que celui attendu par l'analyse d'acides aminés. Si l'albumine était faite de 2 chaînes identiques, le nombre des spots observés serait réduit de moitié.

L'analyse d'amino acides montre l'existence de 35 résidus CYS et l'étude des ponts disulfures par la méthode de Brown et Hartley montre que 17 ponts disulfures peuvent être clivés par l'acide performique.

Sur les 35 résidus, 34 sont donc appariés dans la formation d'un pont disulfure intracaténaire et un reste libre.

L'étude de ce groupement sulfhydryl libre et les différents problèmes posés par son titre dans les échantillons d'albumine seront envisagés ultérieurement.

Pour résumer l'on peut donc proposer à la lumière des faits précédents le schéma général suivant pour la molécule d'albumine :



Les propriétés physiques de cette molécule sont données dans le tableau suivant : (voir page 17)

II - PRODUITS DE L'HYDROLYSE PARTIELLE : Clivages et fragments de séquence

Il est possible de dégrader la protéine en fragments plus petits. Foster l'a clivée en fragments ayant même masse moléculaire, avec un détergent et la subtilisine.

Weber a coupé la molécule en deux fragments par la pepsine.

Ces fragments obtenus par digestion enzymatique possèdent généralement les mêmes propriétés antigéniques que la molécule mère (Press et Porter, Lapresle).

L'unique résidu tryptophane de la molécule a donné lieu à un clivage chimique sélectif par le N bromo succinimide.

L'étude de la séquence au voisinage de ce résidu montre des suites identiques pour le sérum albumine bovine et humaine :

Try - Ala - Val - Ala - Gly - Ala (humaine)

Try - Ala - Val - Ala - Gly - Ala (bovine)

De même, le peptide porteur du seul groupement SH réactif a une séquence identique chez l'homme et chez le boeuf (Sugae et Jirgensons).

Leu - Gln - Asp - Gly - Gln - Glu - Cys - Pro - Phe

Par contre, l'albumine bovine et l'albumine humaine diffèrent par leur séquence aux deux extrémités de la chaîne.

Witter et Tuppy à l'aide d'un marqueur coloré des groupements SH libres : le N/4(4.diméthyl amino 3,5 dinitrophényl) - Maléimide, ont réalisé la séquence d'un peptide pepsique porteur de ce groupement.

Ce peptide aurait la séquence suivante :

Gln - Asp - Glu - Gln - Glu - Cys - Pro - Phe
                              |
                             SH

III - MASSE MOLECULAIRE ET PARAMETRES PHYSIQUES

L'albumine plasmatique est rarement obtenue à l'état de monomère et il existe une incertitude sur la masse moléculaire de l'ordre de $\pm$ 2000.

La valeur la plus communément admise est 65000 avec pour S20,w = 4,31 S et D20,w = 6,15 unités Fick.

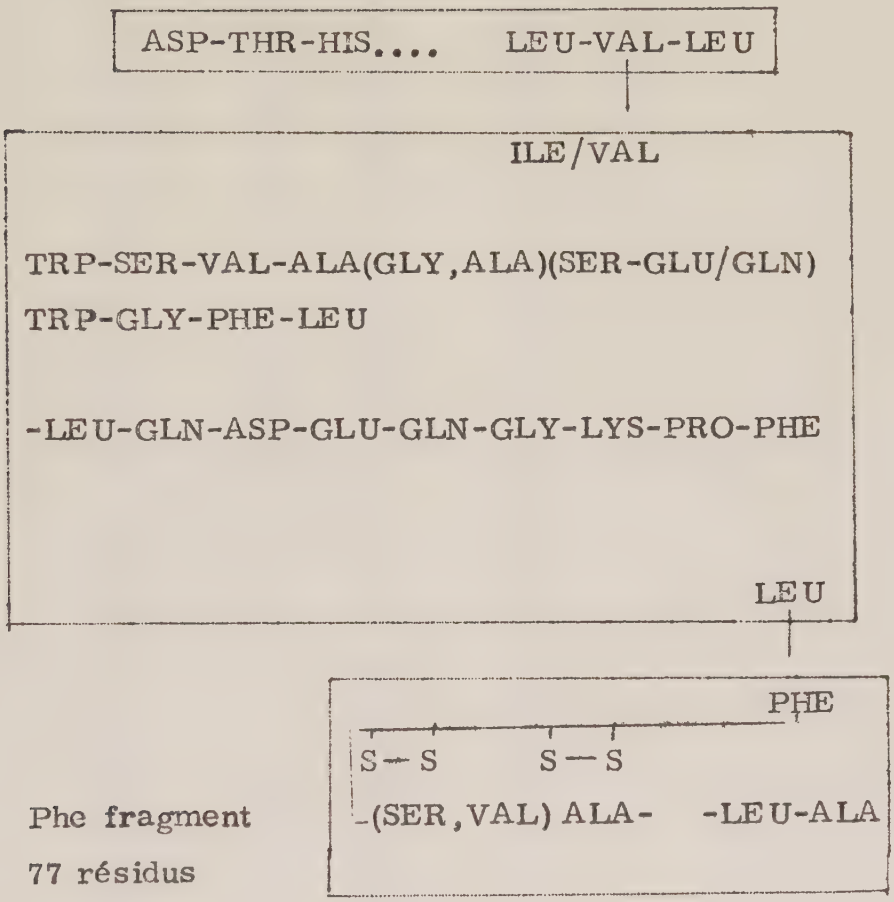
Il est parfois utilisé dans la littérature des valeurs de 69 000, voire 70 000.

Le fait que la masse moléculaire d'une protéine aussi étudiée ne soit pas connue avec plus de certitude fait apparaître l'insuffisance des méthodes actuelles de détermination des masses moléculaires de protéines.

SEQUENCE PARTIELLE DE LA

B S A

(d'après Peters (66)



Phe fragment

77 résidus

SEQUENCE DU PEPTIDE 1-24 OBTENU PAR HYDROLYSE
PEPSIQUE DES ALBUMINES DE BOEUF, RAT, HOMME

		5	10	15	20
Bov	ASP-THR-	HIS-LYS-SER-GLU-	ILE-	ALA-HIS-ARG-PHE-LYS-ASP-LEU-GLY-GLU-	GLU-HIS- PHE-LYS- GLY- LEU- VAL-LEU
Rat	GLU-ALA-	HIS-LYS-SER-GLU-	ILE-	ALA-HIS-ARG-PHE-LYS-ASP-LEU-GLY-GLU-	GLN-HIS- PHE-LYS- GLY- LEU- VAL-LEU
Hom	ASP-ALA-	HIS-LYS-SER-GLU-	VAL-	ALA-HIS-ARG-PHE-LYS-ASP-LEU-GLY-GLU-	GLU-ASN- PHE-LYS -ALA- LEU VAL-LEU

sont entourés les segments de séquence communs aux trois espèces

- CONSTANTES PHYSICO-CHIMIQUES

$S_{20,w}$	4,3
$D_{20,w}$	6,1
$\bar{v}_{20}$	0,733
M.M.	69 000
f/f_o	1,28
η	0,042
Mobilité électrophorétique	5,92
pHi	5,3
E_{280}	5,8

(Schultze et Heremanns)

- MORPHOLOGIE GENERALE DE LA MOLECULE

La détermination de la taille et de la forme de la molécule d'albumine n'échappe pas à la règle de difficulté qui régit les mêmes déterminations pour les autres protéines. La nécessité de faire des hypothèses sur l'hydratation et le modèle théorique rend problématique l'interprétation des résultats. Les valeurs du rapport axial calculé d'après des données de viscosimétrie en supposant une hydratation de 0,1 g d'eau par g. de protéine, sont de 4,2 pour un ellipsoïde allongé et de 5,4 pour un ellipsoïde aplati. Ces données sont à peu près confirmées par la diffraction des rayons X.

L'étude de l'expansion acide que nous allons envisager plus loin nous montrera qu'en fait l'albumine a une structure plus flexible que ces résultats ne le laisseraient penser.

IV - GROUPEMENT SH, MERCAPTALBUMINE ET DIMERE MERCURIEL

1 - Dosage du groupement SH :

Du fait de son extrême réactivité le groupement sulfhydryl est facile à détecter et de grande importance pour diverses réactions avec les protéines.

Certaines protéines ne contiennent pas de groupement SH et ont un groupement SH masqué dans la protéine native.

Différents auteurs utilisant des méthodes de dosage variées ont trouvé pour l'albumine plasmatique native, un titre de moins d'un groupement sulfhydryl par molécule. Le titre obtenu étant pour la plupart de 0,66 (SH)/mole. Selon Benesch et Benesch, ce titre passe de 1 en présence d'urée 8 M et retombe à sa valeur initiale lorsque la protéine est renaturée dans la solution initiale à condition que le pH reste inférieur à 6.

2 - Mercaptalbumine et dimère mercuriel :

Hugues (1957) s'est servi de la grande affinité du mercure Hg pour le groupement SH pour séparer de la protéine totale la fraction contenant ce groupe à l'état actif.

Cette fraction, après repurification et recristallisation, contient 1 sulfhydryl par molécule et est appelée mercaptalbumine.

En dehors du titre en SH, rien ne distingue la Mercaptalbumine de la non Mercaptalbumine, en particulier la composition en acides aminés est identique (Spahr, et Edsall).

La réaction de préparation consiste en l'addition Stoechiométrique de chlorure de mercure. Les molécules qui contiennent un groupement SH libre donnent lieu à la formation d'un dimère selon la réaction :

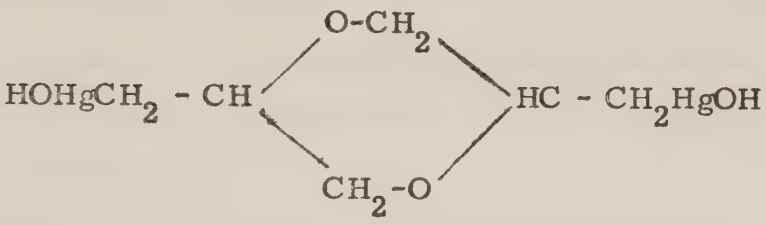
$$2\ Alb - SH + HgCl_2 \rightleftharpoons Alb - S - Hg - S - Alb + 2\ H^+ + 2\ Cl^-$$

Le dimère a une constante de sédimentation de 6,5 S. Il est moins soluble que le monomère et peut être séparé par cristallisation alors que la fraction non dimérisée reste en solution.

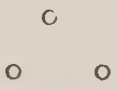
Après recristallisation le mercure peut être enlevé laissant la Mercaptalbumine purifiée titrant 1 SH par Mole de constante de sédimentation de 4,5 S.

La réaction de dimérisation est lente et ceci est dû à la faible probabilité qu'ont deux grosses molécules de se rencontrer dans une position permettant la dimérisation.

Elle peut être accélérée en utilisant des organomercuriels de type :



qui ne rendent pas nécessaire une approche aussi étroite entre les deux molécules.



Ainsi le monomère est représenté principalement par la chaîne pourvue de groupement SH réactif et le dimère d'albumine résulte de la formation d'un pont disulfure intercaténaire entre deux chaînes de Mercaptalbumine.

En présence de composés possédant un SH réactif (Cystéine, Glutathion) la non Mercaptalbumine peut être convertie en mercaptalbumine par une réaction d'échange de groupements SH (Te Piao King).

V - COMPORTEMENT A pH ACIDE

Ce paragraphe est consacré aux altérations structurales qui intéressent le sérum albumine quand le pH de la solution est nettement inférieur au pHi. Ces modifications semblent être pour la plupart réversibles.

- EXPANSION ACIDE

En 1962, les résultats de différents travaux permettaient de penser que l'albumine subissait des modifications structurales importantes aux zones extrêmes de pH. Les moyens d'étude étaient :

a) - la polarisation de la fluorescence qui montrait un taux de rotation plus élevé aux pH extrêmes.

b) - La viscosité augmentée à ces mêmes pH.

c) - L'amplitude augmentée de la lévorotation au dessus de pH 4.

Yang et Foster (1954) montrèrent alors que tous ces changements pouvaient s'interpréter par l'hypothèse que la molécule d'albumine subissait à pH < 4 une expansion isotrope.

Cette expansion serait d'origine principalement électrostatique. Elle obéirait à la loi du tout ou rien et la transition de l'état compact à l'état expansé serait discrète. Cette augmentation du volume hydrodynamique de la molécule est réversible. Elle n'a lieu qu'après être passée à un état permissif, autorisant l'expansion. Cet état est atteint après que des forces de stabilisation intra moléculaires aient été annulées.

L'expansion acide est inhibée par l'élévation de la force ionique des solutions.

- ISOMERISATION : LA TRANSITION N-F

Luetscher (1939) montre pour la première fois que les mieux purifiées des préparations d'albumine présentaient une hétérogénéité électrophorétique au voisinage de pH 4.

Aoki et Foster (1957) poussèrent plus avant l'étude de ce comportement électrophorétique anormal. Voulant éviter l'inhibition de l'expansion, ils choisirent d'opérer à une force ionique $\ll 0,02$.

Dans ces conditions il fallait utiliser des solutions de protéines très diluées.

A 0°C ils observèrent 2 bandes entre pH 3,5 et 4,5, l'intensité de chacune des bandes dépendant étroitement du pH.

La forme normale existant à pH $\geqslant$ 4,5 est appelée N et la forme nouvelle plus rapide F. Ils montrèrent que la réaction correspondait à un schéma du type :

$$N + n\,H^{+} \rightleftharpoons F$$

La différence de mobilité entre les deux formes correspondant à une différence de 3 charges unitaires. Des expériences de salting ont confirmé la réalité de cette isomérisation. Le sérum-albumine peut être précipitée par Na_2SO_4. Des courbes de solubilité en fonction du pH indiquent que la forme F est moins soluble que la forme N.

D'autres propriétés varient dans la zone de pH de l'isomérisation. Il en est ainsi du pouvoir de dispersion optique rotatoire qui décroît dans cette zone de p^{H}. Cette modification est entièrement distincte de celle qui survient lors de l'expansion acide de la molécule.

Alors que cette dernière est éliminée par de fortes concentrations ioniques, la décroissance observée de la D.O.R. au voisinage de pH 4 n'est pas affectée par la force ionique.

- AGREGATION

On a décrit une tendance de l'albumine a se polymériser dans les zones de pH acide. Il semble que ce phénomène soit à mettre en relation avec l'expansion acide qui, libérant des groupements hydrophobes, permet l'agrégation inter moléculaire.

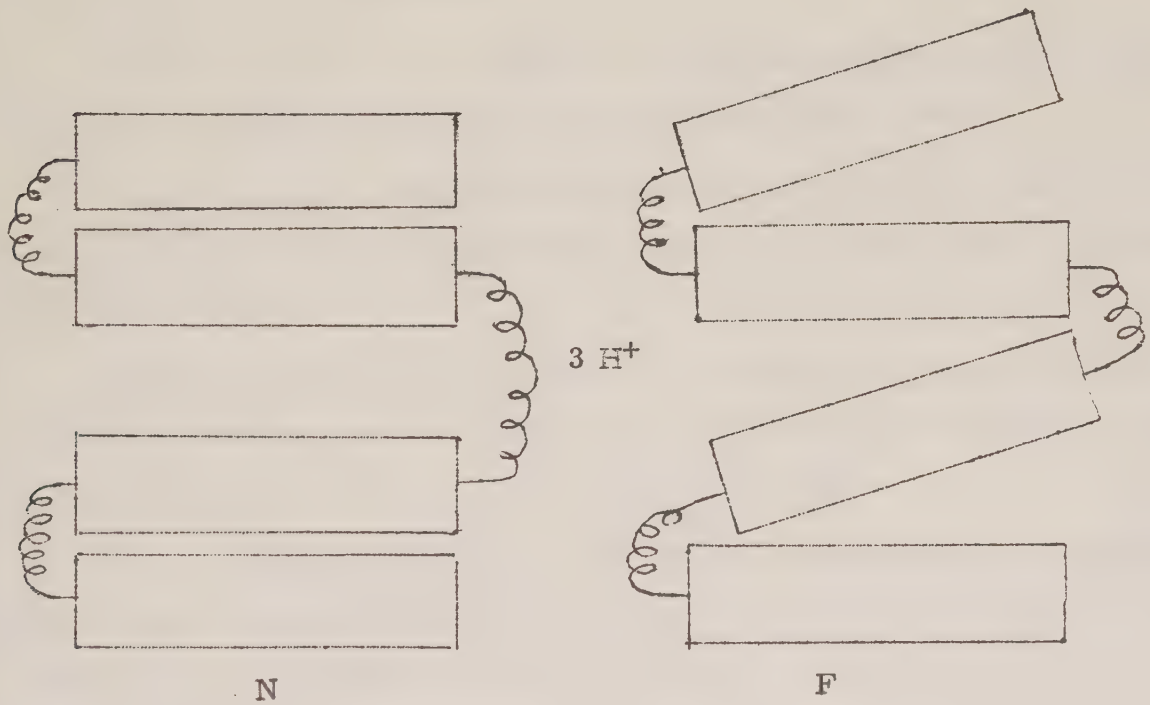
VI - STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

Pour expliquer toutes les aberrations constatées pour certaines propriétés de la molécule à pH acide :

- titrage des protons H^{+}

- transformations N - F
- constante de sédimentation (expansion acide)
- fixation non coopérative des détergents,
- viscosité spécifique...

Foster propose un modèle qui en rende compte tout en respectant le fait que l'albumine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique. Il suppose que la molécule est formée de 4 sous-unités identiques, accouplées deux à deux et reliées entre elles par une chaîne polypeptidique flexible. Cet état apparié correspondrait à la forme normale N et serait détruit par répulsion électrostatique à pH 4 donnant naissance ainsi à la forme F.



Modèle de Foster

(in Putman - The Plasma Proteins)

L'hypothèse de ce modèle a reçu plusieurs types de confirmation :

1 - Des études de diffusion centrale absolue des rayons X ont montré que 35 % de la molécule subissait à pH acide un déroulement et que le reste de la molécule demeurait dans sa forme compacte.

2 - Il était pensable pour tester cette hypothèse, d'essayer de cliver les segments linéaires seuls par une hydrolyse protéolytique douce et brève en milieu acide.

On devait s'attendre alors à ce que les fragments linéaires accessibles soient seuls clivés pendant que les masses compactes aux sites de clivage inaccessibles restent intactes.

Weber et Young ont réalisé une hydrolyse peptiqueà pH 3 qui sépare la molécule en plusieurs unités de masse moléculaire élevée.

Les mesures, notamment de polarisation en lumière fluorescente, faites sur les fragments ainsi obtenus sont en bon accord expérimental avec le modèle proposé.

Un calcul fait avec l'hypothèse d'une orientation aléatoire et d'un pouvoir de fixation égal de tous les sites de fixation de la molécule, donne la distance de 27 Å entre deux de chacun de ces sites.

Les fragments peuvent être séparés en 2 types sur D E A E cellulose. Les fragments de type I ont une masse moléculaire moyenne de 12 500. Ils forment 55 % de l'hydrolysat. Les fragments de type II ont unemasse moléculaire de 30 000 et représentent 45 % de la molécule. Ils présentent la propriété de se réassocier en milieu plus alcalin avec une constante d'action de masse de $4,5 \times 10^5$ M et à pH 5.

Selon les auteurs la molécule native d'albumine serait constituée de 1 fragment de type II et de 2 ou 3 fragments de type I liés ensemble par le continum de la chaîne polypeptidique.

3 - L'étude par diffusion centrale absolue des rayons X montre qu'au voisinage du point iso-électrique (pH 5,3) le B S A est une molécule compacte.

Des modifications importantes surviennent à pH 3,6 (expansion acide)

- le rayon de giration passe de 30,6 Å à 68,5 Å

- la masse moléculaire ne change pas,

- les résultats expérimentaux ne sont plus compatibles avec une molécule uniformément compacte .

Un modèle qui suppose le déroulement à pH acide d'une partie de la chaîne polypeptidique (35 %) le reste demeurant enroulé en une masse compacte, est en accord avec les résultats expérimentaux de diffraction centrale des rayons X.

VII - LIGANDS : PROPRIETES BIOLOGIQUES

Contrairement à ce qui existe pour d'autres protéines dont le pouvoir de fixation est extrémement spécifique, celui de la sérum-albumine est remarquable par sa non spécificité. Toutefois, celle-ci concerne particulièrement les anions.

- Cations :

Parmi les cations légers seuls le Na^{+} et surtout le Ca^{++} ont été rapportés comme étant fixés par la sérum-albumine à pH élevé.

Parmi les cations plus lourds, les métaux tels que le Cu^{++}, le Pb^{+++} le Zn^{++}, Cd^{++} ont fait l'objet d'une étude d'affinité. On a montré que le Zn^{++} et Cd^{++} étaient fortement liés, probablement sur les noyaux imidazole des histidines. Le plomb, fortement lié, se fixe selon une stoechiométrie d'au moins 73 ions/mole sur les radicaux carboxyl de la molécule. Pour le cuivre, il existe un site ayant une forte affinité et plusieurs autres ayant des affinités plus faibles.

Peters (1967) a montré que ce site résidait dans le peptide 1-24 (masse moléculaire 2808) résultant de l'hydrolyse peptique et que c'était la séquence terminale Asp-Thr --His-Lys de cet "Asp fragment" qui était responsable de liaison. En outre, il a montré que l'influence du corps de la molécule était négligeable vis à vis des propriétés de fixation de ce site.

La fixation du cuivre est sur ce site équimoléculaire.

- Fixation des anions :

Tous les anions semblent se lier d'une façon appréciable à l'albumine L'affinité de celle-ci pour les anions est beaucoup plus forte que pour les cations. La combinaison de la S.A. aux anions a fait l'objet de nombreuses études et il faut distinguer les petits anions de ceux de taille moyenne tels que les colorants et, enfin, les détergents.

- Petits anions :

Cl^-, Br^-, NO_3^-, I^- se fixent à l'albumine avec une affinité croissante. De même CO_3H^-, CH_3COO^- véronal, citrate....

Il ne semble pas qu'il y ait de site privilégié pour chacun de ces anions et que l'ensemble de ceux-ci se fixe sur les mêmes sites. Par contre, il a été montré qu'il existait pour le tryptophane un site de liaison très affine et de grande spécificité puisqu'il fixe 100 fois plus la forme L que la forme D.

- Colorants :

Le pouvoir de fixation des colorants par l'albumine est connu depuis longtemps. En 1925, Grollmann fit des études de liaisons de la phénol-sulfone-phtaléine et montra que ce colorant était fixé par l'albumine.

L'affinité de la S.A. pour les colorants est 100 fois supérieure à celle des petits ions. La liaison ne semble pas se faire sur un site spécifique de la molécule mais être due seulement à des interactions hydrophobes. Parmi les substances biologiquement actives de cette catégorie on doit citer la bilirubine et des hormones telles que la testostérone et la tyrosine.

A propos de cette dernière Tritsch et Tritsch (1963) ont montré que l'albumine pouvait fixer jusqu'à 6 molécules de tyroxine mais qu'un seul parmi ces sites était fonctionnel et spécifique. Son activité dépend fortement du pH. Il serait lui aussi à l'extrémité N terminale car l'acétylation du groupe alpha aminé de l'ASPN terminal diminue le pouvoir de fixation du site. De plus, le tryptophane connu pour se fixer électivement sur l'ASP N terminal agit comme inhibiteur compétitif de la tyroxine à pH 7,35.

Il est à remarquer l'absence de spécificité de ce site qui fixe non seulement le TRP et la tyroxine mais aussi le cuivre.

- Agents tensio-actifs :

Comme toutes les protéines la SA fixe fortement les détergents. Ceci n'est pas une propriété spécifique de la molécule. L'aspect le plus intéressant de cette interaction hydrophobe de la S.A. avec les agents tensio-actifs tels que le S D S, est que la liaison a un caractère coopératif et qu'il s'effectue selon une stoechiométrie déterminée. Le nombre de sites occupés par le détergent varie de 8 à 80 mais les transitions entre les différents niveaux sont discrètes.

- Acides gras :

Il est connu depuis longtemps que les préparations de sérum-albumine contiennent des quantités variables d'impuretés lipidiques.

Ces impuretés consistent en acides gras libres (non estérifiés). L'analyse chromatographique (gazeuse - liquide) montre la présence de nombre de ceux-ci : oléique, palmitique, stéarique et linoléique en particulier.

o

o o

VIII - RELATIONS STRUCTURE - FONCTION

Deux propriétés remarquables ressortent de l'étude de cette protéine :

- l'affinité pour les ions et en particulier les anions,

- les transformations réversibles importantes qu'est capable de subir la molécule.

Que ces deux propriétés soient liées entre elles est difficilement réfutable. Qu'elles soient à l'origine de la fonction physiologique de la molécule fait également peu de doute. Il est vraisemblable que c'est à l'occasion de transformations du type de celles envisagées précédemment (N - F) que l'albumine fixe toutes ces substances ioniques ou non, mais particulièrement les substances hydrophobes jusqu'à ce qu'un environnement ionique favorable permette le retour à la forme ouverte de ce transporteur universel et que la substance soit ainsi libérée.

Le deuxième aspect de son rôle physiologique, à savoir le maintien de 75 % de la pression oncotique est expliqué aussi par deux propriétés physicochimiques de la molécule.

1 - sa masse moléculaire est inférieure à la valeur moyenne de celle des autres protéines plasmatiques (65 000/ 70 000).

2 - Sa charge nette dans les conditions physiologiques est plus élevée que celle des autres protéines du fait de son point isoélectrique bas, mais aussi du grand nombre d'ions qui lui est fixé. L'effet Donnan qu'elle détermine est ainsi plus important que pour les autres protéines.

Ainsi sont mises en parallèle avec la structure deux types de fonctions de la molécule d'albumine.

oOo

HETEROGENEITE

PHYSIO-CHIMIQUE

En dehors des variations génétiquement transmises, la sérum-albumine humaine de type "sauvage" se présente sous diverses formes moléculaires.

- Alors que la forme-type est constituée d'une seule chaîne, on peut rencontrer dans diverses préparations d'albumine des formes polymériques et en particulier, dimériques. De même, il existe dans la forme de référence un groupement SH libre alors qu'on ne titre, en fait, dans les échantillons que 0,70 Eq SH/mole.

En dehors de ce type d'hétérogénéité que nous pourrions qualifier de macrohétérogénéité, l'albumine possède une autre propriété plus remarquable connue depuis les travaux de Foster sous le nom de microhétérogénéité.

Ce sont ces deux types d'hétérogénéité moléculaire que nous allons envisager maintenant.

I - MACROHETEROGENEITE

1 - Chromatographie d'exclusion :

Diverses préparations de sérum albumine bovine ont été fractionnées par chromatographie d'exclusion sur Sephadex (G. 100, G. 150 et G. 200) en monomère, dimère alors que les trimères et les polymères de degré plus élevé ont été enrichis dans d'autres fractions.

Le dimère peut être obtenu avec un degré de pureté voisin de 100 %. Le monomère donne des courbes d'élution dissymétriques indiquant la présence de plus d'un composant de masses moléculaires voisines.

La dissymétrie peut être interprétée comme la présence de plusieurs monomères chimiquement différents d'albumine mais de même masse moléculaire.

Ceci pourrait être correllé avec le fait qu'il existe plusieurs variétés de monomères.

Comme il a été montré par de nombreux investigateurs, la S A n'est pas homogène. Un des faits les plus probants de cette hétérogénéité est le titre en groupement SH qui est toujours inférieur à 1 thiol/molécule. L'on a donc considéré qu'il existait dans la protéine native au moins deux sous-espèces moléculaires distinctes, la mercaptalbumine et la non mercaptalbumine dont le titre en SH est nul.

En fait, cette discrimination peut être encore poussée plus avant et chacune des 2 espèces possède plusieurs sous-espèces. Ainsi la non mercaptalbumine qui est représentée de 25 à 50 % du total selon les échantillons est un mélange de 2 ou 3 composants monomériques.

Ces molécules sont, pour une part, des composés dont le groupement SH est engagé dans une liaison avec la cystéine ou pour une plus faible part avec le Gluthation.

De même la fraction polymérique, présente dans toute préparation d'albumine n'est pas non plus homogène. Une partie seulement du dimère peut être transformée en monomère par des ponts disulfures inter caternaires.

La mercaptalbumine est oxydée en dimère par le ferricyanure, en présence de Guanidine 4 M, et une filtration sur gel séparé ensuite le dimère formé du monomère non oxydable.

Le titre du groupement SH de la fraction monomérique tombe à 0,02 SH_2/mole. Dans la fraction dimérique le titre est nul.

1 - Cette opération est impossible lorsque les groupements thiols sont bloqués par le p CMB.

2 - Cette réaction est réversible par l'action du beta mercapto-éthanol qui transforme tout le dimère Alb - S - S - Alb en mercaptalbumine(Alb-SH)

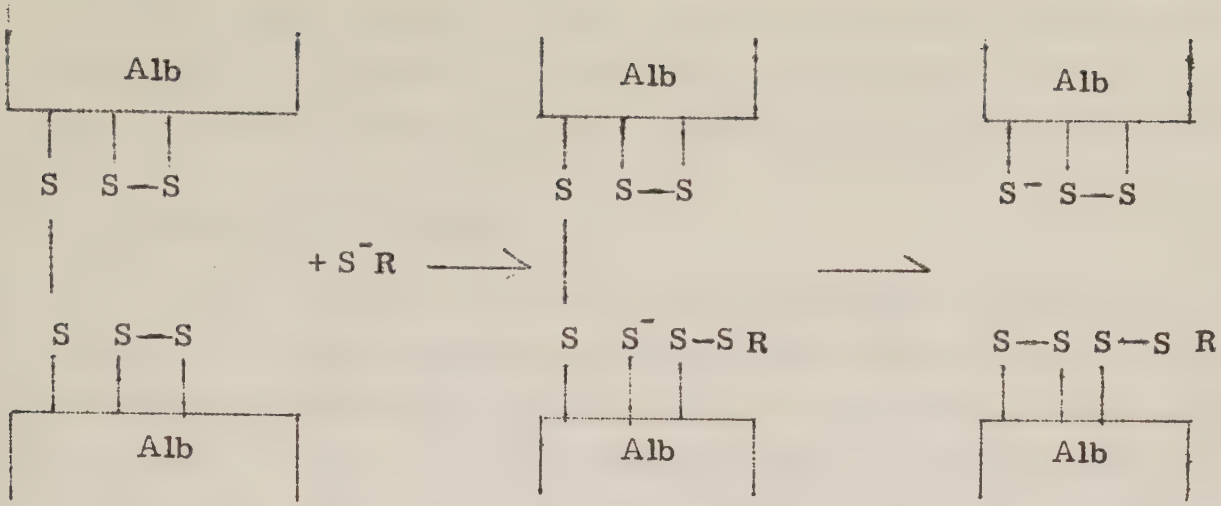
La présence de Guanidine ou d'urée est indispensable pour que cette réaction se produise. Dénaturée par un détergent tel que le laury-sulfate de sodium, l'albumine ne donne pas lieu à la réaction de dimérisation.

Le groupement SH de la mercaptalbumine fixe plus d'un équivalent d'Ag^+ par groupe dans les milieux dénaturants. Comme pour d'autres composés comportant un thiol, le groupe carboxyl de la cystine semble participer à cette liaison complexe d'un ion argent.

Les milieux dénaturants donc introduisent dans la molécule d'albumine une seconde possibilité de capter un ion Ag^+. Le fait qu'il y ait un ASP et 2 GLU au voisinage du SH pourrait suggérer que l'un d'entre eux participe à ce deuxième type de fixation.

Ceci surviendrait dans les milieux dénaturants par découvrement de ces résidus.

3 - Lors de la réduction du dimère disulfurique intercaténaire, le titre en SH du monomère formé est inférieur à 1. Lorsque la réduction est effectuée par la cystéine, le monomère formé contient de petites quantités de cystéine liées à la protéine. Ceci suggère un mécanisme de réaction où l'agent réducteur attaque tout d'abord un autre groupement et que celui-ci, ultérieurement, rompt le pont disulfure liant les 2 chaînes monomériques. Il a été montré par ailleurs que le SH libre de la mercaptalbumine est très proche d'un deuxième pont disulfure intracaténaire. On a donc proposé le mécanisme suivant :



La liaison S - S - R peut être amenée à se rompre dans la suite de la réaction ce qui expliquerait que le titre en SH du monomère soit compris, comme le montrent les résultats expérimentaux, entre 0,5 et 1 SH/mole.

2 - Chromatographie d'échange d'ions

L'hétérogénéité de la B S A a été étudiée sous l'aspect des relations entre le comportement chromatographique sur D E A E cellulose et le titre en groupements SH libres.

L'hétérogénéité de masse moléculaire (monomères, dimères, polymères de degré plus élevé) et de celle qui concerne les SH libres (mercaptalbumine et non mercaptalbumine) se retrouve dans les études de chromatographie sur D E A E cellulose. En effet, le monomère (4 S) possédant un titre en groupement SH =# 1 pour 4,6 (9000 g) est moins fortement retenu par la résine que le dimère (6 S) de titre en sulfhydryl voisin de zéro.

Cependant la protéine éluée la toute première est de titre en SH très faible.

De même toutes les fractions de non mercaptalbumine n'ont pas la propriété d'être entièrement réduites par le B M E. De même encore la fraction contenant des dimères n'est pas entièrement transformable en monomères par le même réactif.

Ceci tend à prouver que l'on se trouve en face d'une hétérogénéité complexe et qu'à l'intérieur de cette fraction apparemment homogène un grand nombre de paramètres connus et inconnus sont susceptibles de varier.

II - MICROHETEROGENEITE

Avant d'aborder l'étude de la microhétérogénéité, il faut rappeler un fait qui est une des propriétés remarquables de la sérum albumine humaine : En gel de polyacrylamide entre pH 3,5 et 4,5 le monomère purifié d'albumine forme de 2 à 4 bandes. Ces zones sont identifiées à la forme N (N_1 et N_2) et F (F_1 et F_2) telles qu'elles avaient été décrites précédemment par électrophorèse en phase liquide. La forme F devient majoritaire aux dépens de la forme N avec la diminution du pH.

Elle migre aussi plus rapidement en électrophorèse que la forme N. Des études par Sogami et Foster ont montré que des sous fractions peuvent être isolées, qui subissent la transformation N - F à des valeurs de pH légèrement différentes.

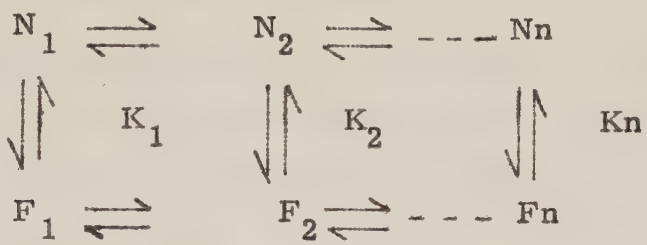
Ce fait laisse supposer que l'albumine n'est pas constituée d'une espèce moléculaire unique mais doit au contraire former une famille d'espèces moléculaires très voisines. C'est pour rendre compte de ce fait que Foster a introduit l'hypothèse de microhétérogénéité que nous allons exposer dans ce qui suit.

Le concept général de microhétérogénéité des protéines a été introduit par Colvin, Smith et Cook. Considérant les données alors disponibles, les auteurs concluaient qu'une protéine native ne doit pas être considérée comme une entité chimique mais, au contraire, comme une populatinn d'individus étroitement voisins qui diffèrent soit de façon discrète, soit de façon continue par un certain nombre de propriétés.

Des anomalies dans le comportement de l'albumine du voisinage de pH 4 et qu'on retrouve dans l'étude de la stabilité thermique amenèrent à penser que ce concept pouvait lui être appliqué.

- Hypothèse de microhétérogénéité (Foster)

L'albumine plasmatique consiste en un grand nombre d'espèces moléculaires très voisines. Il existe une inter conversion très lente entre ces formes qui diffèrent par leur propension à subir la transformation N F réaction qui serait de vitesse infiniment supérieure.



Ainsi les différentes formes N forment une distribution selon les constantes d'action de masse de la transformation N - F. Il existe de bons arguments expérimentaux pour penser que 12 à 15 protons sont intéressés par la transformation N - F. Ceux-ci doivent être liés d'une façon étroitement coopérative pour que, pourune espèce donnée, la transition ait lieu dans une zone de pH aussi étroite.

La conception de microhétérogènéité avait été avancé comme un phénomène général. Il a été ensuite largement mis en question du fait des impressionnants résultats des premières séquences qui tendaient à montre', au contraire, une homogénéité parfaite au moins quant à la structure primaire. Les seuls cas de paucidispersité étant dus à des variations gérétiques.

Il semble douteux qu'une telle hétérogénéité puisse être resporsable de la large distribution d'espèces moléculaires nécessaire à expliquer le comportement de l'albumine. Elle devrait résider plutôt en de petites différences dans la structure secondaire. ou tertiaire de la molécule.

Il est cependant clair qu'ou bien les facteurs responsables de la microhétérogénéité sont de caractère si subtil que les différentes variétés molécu-

laires peuvent cohabiter dans un même cristal, ou bien que la microhétérogénéité survient spontanément au cours du traitement ultérieur de la protéine dissoute.

La formation de multiples bandes en électrophorèse de l'albumine plasmatique au voisinage de pH 4 donnait lieu à l'interprétation selon laquelle le phénomène était dû à une isomérisation dépendante du pH intéressant deux formes prédominantes de la protéine, appelées N et F.

La nature hautement coopérative de cette transformation N - F apparaît lorsqu'on considère le nombre de modifications des propriétés qui accompagnent cette réaction. En effet, ces deux formes diffèrent par :

- leur titre en ion hydrogène,
- leur propriété de solubilité,
- le degré d'exposition des résidus tyrosyl
- leur dispersion optique rotatoire
- leur capacité à fixer les hydrocarbones.

Pour expliquer ce phénomène, Foster a proposé l'hypothèse de la microhétérogénéité pour cette population moléculaire. Plus précisémentl'hypothèse suppose qu'il existe dans un échantillon donné une distribution de population pour le pH auquel les diverses molécules subissent la transformation N- F. Restent à envisager les différents modes par lesquels pourrait s'expliquer cette microhétérogénéité.

Tout d'abord, il fallait éliminer l'origine individuelle différente de la molécule. En effet la plupart des mesures ont été faites sur une préparation d'albumine qui résultait de sérums poolés. Or, les expériences répétées sur une albumine provenant d'un seul donneur fournissent des résultats semblables.

Il semble également justifié d'écarter l'hypothèse de fluctuations survenant dans la composition en acides aminés et dans la séquence de la protéine.

Par contre, une randomisation du nombre ou de l'arrangement des groupements amides pourrait être envisagée d'autant que ceux-ci sont particulièrement nombreux dans la molécule d'albumine.

De même le nombre élevé des cystéines (36) suggère qu'il pourrait se faire entre les ponts disulfures intracaténaires, des échanges dans les appariements.

o

o o

1 - Une confirmation du modèle de microhétérogénéité est donnée par fractionnement avec des solutions de salinité élevée. Les sous fractions ont des transitions N - F propres qui diffèrent les unes desautres, non seulement par cette propriété mais aussi par :

1 - la rotation spécifique à 313 nm en fonction du pH,

2 - un degré variable d'exposition des chromophores comme le montrent les spectres UV

3 - la titration des ions hydrogènes des radicaux Carboxyl, (ε-aminés et phényl)

4 - la stabilité thermique qui est également différente selon les fractions envisagées.

2 - On a suggéré que des différences dans la structure tertiaire de molécules par ailleurs identiques pourraient être au moins en partie responsables de la microhétérogénéité observée dans l'albumine. Pour tester la véracité de cette hypothèse, des préparations de plasma albumine bovine furent soumises à des dénaturations intenses suivies de renaturation. Lors que les groupements SH ne sont pas bloqués on assiste à une augmentation spectaculaire de la microhétérogénéité due probablement à un échange interne des groupements SH.

Lorsque les groupements SH sont bloqués par l'iodacétamide, la distribution de la population reste identique après dénaturation par la Guanidine 6 M à 30° suivie de renaturation. Enfin, lorsqu'une sous-fraction dont on a bloqué les SH est dénaturée puis renaturée, elle conserve ses propriétés.

Ceci montre que les variations de structure tridimensionnelle ne sont pas responsables à elles seules de la microhétérogénéité et que les permutations dans les appariements des ponts disulfures peuvent en être un facteur important (Moore, Foster).

De même alors que la microhétérogénéité est nettement augmentée par le vieillissement de la protéine, le blocage des groupements SH supprime cette évolution. Le blocage n'augmente cependant pas la quantité de polymères, la permutation doit donc se faire à l'intérieur de la molécule.

Il semble évident qu'il doive exister un certain nombre de configurations accessibles à la molécule d'albumine et que la distribution des appariements effectivement réalisés peut dépendre des conditions d'environnement et particulièrement des ligands tels que les acides gras.

D'autres méthodes permettent d'atteindre au même résultat. Ce sont des méthodes de salting-out par dialyse de $(NH_4)_2\ SO_4$ à travers une membrane semi-perméable.

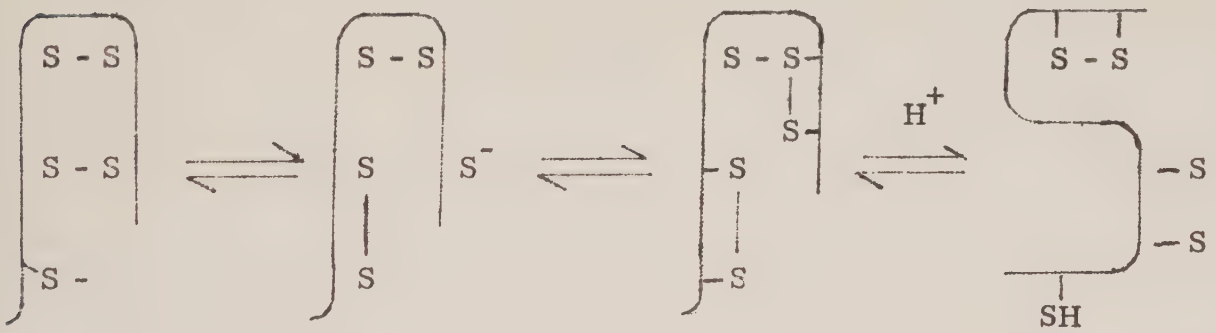
Des courbes de la quantité de protéine restée en solution en fonction de la concentration en $SO_4\ (NH_4)2$ peuvent être dressées. En préparant des fractions par un salting-out "step-wise", on obtient des faisceaux de courbes $S = f(\Sigma)$ (S est la solubilité de la protéine et est la salinité de la solution.) caractéristiques de chaque fraction. Après dénaturation - renaturation de ces fractions alors que les SH sont bloqués et que la protéine est délipidée, les courbes de chacune de ces fractions restent inchangées. Au contraire, en l'absence de ce traitement préalable on assiste à un élargissement du faisceau de courbes de solubilité ($S = f(\Sigma)$.

III - AUTRE FORME D'HETEROGENEITE : le VIEILLISSEMENT

La bovine mercaptalbumine subit un processus de vieillissement lorsqu'elle est conservée en solution aqueuse en milieu alcalin de faible force ionique.

Un composé (A) est alors formé qui peut être séparé de la protéine native (N) par électrophorèse ou chromatographie d'échange de cathions. Le nouveau composé à un pHi = 5,2 au lieu de 4,8 pour la protéine native et diffère de celle-ci par ses propriétés de solubilité et son pouvoir de dispersion optique rotatoire. Cependant les 2 structures semblent identiques aux pH extrêmes.

La réaction est complètement inhibée quand le groupement SH libre est bloqué mais peut être induite dans la protéine bloquée par un agent réducteur. La réaction est réversible avec une constante d'équilibre voisine de l'unité à pH 5,6



Mécanisme de réaction proposé par Foster pour le vieillissement de la mercaptalbumine.

Dans le mécanisme représenté par la figure ci-dessus la molécule native de B S A subit une transconformation qui amène le SH libre au voisinage d'un autre pont disulfure qui doit participer à la réaction. Ces groupes sont à la surface de la molécule puisqu'ils sont accessibles au B M E. L'ionisation du groupement SH et la transconformation se produisant dans le même intervalle de pH (au voisinage de pH 8,3).

Le composé A à une conformation qui ne l'autorise pas à revenir à la forme native quand le pH est abaissé. Elle reste donc sous cette forme à pH acide ce qui explique la différence de charge, de solubilité et de pouvoir de dispersion optique rotatoire observées.

Ces résultats sont d'un intérêt particulier vis à vis du postulat selon lequel la structure tridimensionnelle est dictée par la séquence, et qu'il devrait n'y avoir qu'une configuration des appariements des groupements SH correspondant à la stabilité maximale.

A la lumière de ces travaux, il apparaît que la structure primaire de la mercaptalbumine bovine conduit à 2 formes différentes par leur structure tridimentionnelle également stables à pH 9,5.

oOo

HETEROGENEITE GENETIQUE

VARIATIONS GENETIQUEMENT TRANSMISES DE LA SERUM ALBUMINE HUMAINE

I - BISALBUMINEMIE

La présence, a côté du constituant albuminique normal, d'une fraction d'albumine de mobilité électrophorétique différente, génétiquement déterminée, et dont la quantité est, pour chacune des fractions, égale à la moitié du taux normal d'albumine, s'appelle depuis 1955 (date à laquelle l'anomalie a été observée la première fois par Scheurlen) : bisalbuminémie.

Le terme d'alloalbuminémie aurait l'avantage, non seulement de rendre plus cohérente la terminologie des variants génétiquement transmis des protéines sériques, mais aussi de s'appliquer également à la forme homozygote de l'anomalie.

En effet, ce caractère électrophorétique est transmis comme un caractère autosomal, co-dominant à pénétrance complète et correspond à un génotype hétérozygote. Des cas d'homozygotie ont été rapportés dans les populations où la fréquence du gène est grande. Ils ne peuvent être repérés en l'absence du dédoublement caractéristique que par une étude soigneuse de la mobilité électrophorétique dans la zone de l'albumine.

La protéine anormale peut être électrophorétiquement plus rapide ou plus lente que l'albumine normale. Mais l'on peut compter maintenant 15 types distincts de variants selon leur mobilité électrophorétique (Lie Injo et Al. 1971), parmi la cinquantaine de familles qui a été rapportée.

Mobilités électrophorétiques comparées des variantes d'albumine dans 4 systèmes différents
Mobilité 1 < 2 < 3 < 4 < 5 < 6 < 7 (d'après Weitkamp)

Désignation actuelle	Autre désignation	Origine Ethnique	Gel d'Amidon		Acétate de cellulose	
			pH 5,0	pH 6,9	pH 8,6	pH 5,0
Alb B	Very slow Ann Arbor Jensen	Nord Européenne	1	1	1	1
Alb. Gainesville		Irlande	1	2	3	2
Alb Paris	Slow	France	2	3	2	2
Alb Gombàck		Malaisie				
Alb Cayennite		Antilles				
Alb Mexico		Indiens d'Amér. Centrale	3	3	2	3
Alb Vimba		Nouvelle Guinée				
Alb A	Alb. Normale		4	4	4	4
Alb Medann						
Alb New-Guinea	Alb. reading	GB-Nlle Guinée	6	5	5	5
Alb Maku		Indiens Amer. centrale	5	7	5	5
Alb Naskapi	Learson	Indiens Amer. Nord	7	6	6	6
Alb Family 17	Very fast	Scandinav. Belgique	8	8	7	6

Le typage est fait par la comparaison en électrophorèse verticale en gel d'amidon dans 3 systèmes de tampons selon la méthode décrite par Weitkamp.

1 - Acétate de sodium - EDTA - pH 5,0

2 - Tris - EDTA Borate pH 6,9

3 - Tris succinate citrate de lithium pH 6,0

On distingue ainsi 15 types. Selon la mobilité électrophorétique croissante dans le premier système électrophorétique :

lentes ↑	1	Alb B	↑	8	Mexico
	2	Gainesville		9	Vimba
	3	Paris / Gomback		10	Alb A (Albumine normale)
			rapides	11	Medan
	4	Afghanistan		12	New Guinea
	5	Santa Ana		13	Naskapi
	6	Cartago		14	Maku
	7	Cayemite	↓	15	"famille 17"

L'étude structurale faite à deux reprises (Gitlin et al. 1961) et (Weitkamp et al. 1972) sur le "variant" lent d'origine Nord Européenne (Alb B) indique que le "variant" représente une mutation ponctuelle présentant une seule substitution d'amino acide ou un GLU est remplacée par une LYS.

Il est raisonnable de penser que la plupart des mutants décrits représente une série d'allèles pour le gène de structure de la sérum-albumine humaine. Les études structurales à venir confirmeront vraisemblablement cette hypothèse.

Dans aucun des cas rapportés, l'anomalie électrophorétique n'a pu être mise en corrélation avec une situation pathologique quelconque, bien que les premiers auteurs y eussent vu une relation possible avec le diabète,

qu'un des cas (Alb. Santa Ana) présentait une cardiomégalie ou encore que d'autres étaient issus d'un groupe de malades provenant d'un service d'orthopédie.

o

o o

La fréquence du gène est variable.

Dans la population européenne, c'est un variant lent qui est rencontré le plus fréquemment. Une trentaine de cas ont été rapportés depuis l'observation initiale de Scheurlen. Mais il existe aussi deux types de variants nord européen où la protéine mutante était plus rapide que la protéine normale (Wieme 1969, 1962, famille 17), (Tarnoky et Lestas 1964, Alb. reading ou New Guinea).

Efremov trouve dans la population norvégienne un cas sur 1015 sérums examinés.

Il existe également un troisième variant lent Alb Gainesville (Lan et Sundermann 1968) et un quatrième décrit en France par Sandor (Alb. Paris).

Mais dans certaines populations, le gène est présent avec une fréquence beaucoup plus grande. Ainsi les populations américaines du Nord et du Sud se sont révélées porteuses de plusieurs variants albuminiques différents mais ayant toujours une fréquence élevée dans l'ensemble de la population (Melartin et Blumberg, 1964). observent chez les indiens Naskapi du Quebec 37 sujets porteurs sur 151 examinés ce qui représente une fréquence de 0,13 pour cette population. Ils ont d'ailleurs l'occasion pour la première fois de rapporter le cas d'un homozygote. Le mutant était de type rapide et il cons-

titue à lui seul un type original par sa mobilité électrophorétique. Il a été retrouvé présent dans des populations amérindiennes plus ou moins voisines des Naskapi avec cependant des fréquences différentes.

	Fréquence du phénotype			Fréquence du gène	
	NAS/NAS	A/NAS	A/A	A_1^{Nas}	A_1^{A}
		NASKAPI - Quebec			
Observée	1	37	113	0,13	0,870
attendue	2,6	34,1	114,3		
		MONTAGNAIS - Canada			
Observée	2	14	96	0,08	0,92
Attendue	0,6	16,5	94,8		
		SIOUX - US			
Observée	0	2	158	0,007	0,993
Attendue	0	2,2	157,8		
		ATHABASCAN - Alaska			
Observée	1	11	218	0,028	0,972
Attendue	0,2	12,4	217,4		
		TLINGIT - Alaska			
Observée	0	1	99	0,005	0,995
Attendue	0	1	99		

d'après Mélartin et Blumberg

Les auteurs affirment que la raison de la fréquence élevée de ce gène dans ces populations doit être d'origine sélective sans pour autant proposer l'éventualité d'un avantage sélectif quelconque corrélable avec la présence de ce gène.

Ce variant a été trouvé également dans plusieurs populations amérindiennes telles que les Navajo, Chippewea, Cree, Algonkins (Robbins, Weitkamp, Ball). Un autre variant rapide (Alb. Maku) provient des indiens Yanonana du Venezuela. Un autre variant Alb. Mexico lent celui-là, a été rapporté pour la première fois par Melartin et Blumberg chez les indiens Mestizo et Rapotec du Mexique. Il a été trouvé une autre fois chez les indiens Pima (Poleski 1968) avec une fréquence génique de 0,03.

Un deuxième variant rapide a été observé chez les indiens Yanomana du Sud du Venezuela avec une fréquence de 0,004.

Deux mutants ont été décrits dans la population Néo Guinéenne, un lent (Alb. Uimba) et un rapide (Alb. New Guinea) (f = 0,05).

Un variant provient de population noires d'Haïti (albumine Cayemite) deux autres du sud-est asiatique, un de Malaisie (alb. Gomback) lent et l'autre de Sumatra (alb. Medan) rapide.

Un problème intéressant est soulevé par les différences de migration que l'on observe lorsqu'on soumet le variant étudié à plusieurs conditions électrophorétiques distincts.

Ainsi l'albumine Gomback et l'albumine Paris qui proviennent, l'une de Malaisie et l'autre de France sont indistinctibles électrophorétiquement lorsqu'on les soumet au crible de Weitkamp.

Elles présentent toutes les deux une légère instabilité qui les fait se détruire au cours de la conservation prolongée.

Ces caractères communs ne sont pas la preuve que les mutants relèvent d'une même différence structurale, ce qui serait d'ailleurs surpre-

nant compte tenu de l'éloignement génétique des peuples malais et français. C'est pourquoi malgré l'identité de ces deux protéines selon les critères électrophorétiques, l'on a conservé cependant 2 appellations différentes.

Un autre problème est celui des variants d'albumine migrant plus vite dans un système électrophorétique et moins vite dans l'autre. C'est ainsi que l'albumine Paris migre moins que l'albumine Cayemite etl'albumine Mexico dans les systèmes à pH 5,0 et pH 6,0 et plus que chacun de ces 2 variants dans le système à pH 6,9. Il en va de même de l'albumine Santa Anna qui migre moins que l'albumine Mexico à pH 5,0 mais qui ne peut être distinguée de l'albumine Mexico à pH 6,0 et qui, à pH 6,9, se confond et avec l'ambumine Mexico et avec l'albumine Gainesville.

De même encore l'albumine Cayemite migre plus lentement que l'albumine Mexico à pH 5,0 et plus rapidement à pH 6,0 et 6,9.

On pourrait encore citer des cas parmi les variants rapides. Ainsi les différences de mobilité électrophorétique pourraient ne pas dépendre uniquement de différences de pHi mais aussi du pouvoir de fixation ionique des différents mutants. Ainsi les mutants différents auraient une affinité différente pour les ions du premier du 2e ou du 3e système tampon. Il est vraisemblable que la mutation induit un changement dans les propriétés fonctionnelles de la molécule. On sait qu'une des principales fonctions de la molécule d'albumine est précisément le pouvoir de fixation des ions.

Ceci est à rapprocher des cas rapporté par Tarnoky · et Lestas (1964), identifié par Weitkamp comme électrophorétiquement identique à Alb. New Guinea et dont le pouvoir de fixation vis à vis du Bleu de Bromophinol est considérablement diminué par rapport à l'albumine normale alors que dans le cas de Earle, les deux variants fixaient également le bleu de Bromophinol, le pouvoir de fixation du variant par rapport à d'autres ligands de l'albumine tels que la tyroxine ou le cuivre mais aucune étude systématique n'a jamais été entreprise dans ce sens.

- FAUSSES BIS ALBUMINEMIES

Il existe encore un cas particulier qui soulève le problème d'une anomalie génétiquement transmise de la SAH et qui est celui des fausses bis-albuminémies induites par les médicaments du groupe des pénicillines.

On a remarqué, en effet, que certains patients recevant de fortes doses de pénicilline IV développaient un composant albuminique rapide disparaissant à l'arrêt du traitement.

Melartin et Blumberg (1968) qui ont étudié in vitro ces sérums montrent que l'altération de la mobilité électrophorétique survient en présence de beta lactamines que l'effet dépend de la dose, qu'il est transitoire et qu'il est aboli par traitement préalable avec la pénicillinase.

Lorsque la pénicilline est ajoutée à des sérums bis albuminiques vrais, le même dédoublement est observé pour chacun des constituants, variant et sauvage, et ceci est vrai que le variant soit lent ou rapide (le test a été fait sur l'albumine B et Naskapi). L'interprétation de ce phénomène est assez aisée si l'on se reporte aux travaux de Levine et coll. (1966) qui concluent que la liaison des beta lactamines se fait par une liaison amide entre le groupe aminé d'une lysine et le radical carbamyl du noyau lactame. Cette liaison est réversible mais assez stable. Elle est inhibée lorsque le noyau lactame est préalablement détruit par la pénicillinase.

La pénicilline ainsi fixée conférerait alors aux molécules d'albumine qui la portent une charge (-) supplémentaire par son groupe COO^- et augmenterait ainsi sa mobilité électrophorétique.

Il est important de ne pas confondre une telle situation avec une bis-albuminémie de type rapide. Pour cela les 2 critères sont la labilité dans le temps (persistance non supérieure à 8 jours après arrêt du traitement et le fait que les deux constituants ne sont pas en quantités égales.

- ETUDE STRUCTURALE DES MUTANTS DE BIS ALBUMINEMIES

L'albumine oliphant est un variant électrophorétique de la SAH (type B) qui a été observé chez 22 des membres d'une famille américaine d'origine allemande (la transmission en est autosomale et tous les individus porteurs sont hétérozygotes). Le sérum de ces hétérozygotes contient 2 bandes d'intensité égale dont l'une migre à pH alcalin moins vite que l'albumine normale).

Le deuxième variant étudié, l'albumine Ann Arbor, a été observé dans une famille d'origine danoise.

Une étude structurale de la protéine mutée a été entreprise sur ces variants, la seule à avoir été faite sur une bis albuminémie depuis les travaux de Gitlin et al. (1961) qui avaient étudié un variant lent également, appelé albumine B, non distinctible électrophorétiquement de Ann Arbor et de Oliphant. La méthodologie ne comportait, après séparation des deux variants qu'un "peptide-mapping" qui permettait seulement de conclure à la probabilité d'un remplacement d'un aa acide tel que le GLU ou l'ASP par la lysine.

Le travail de Weitkamp et Rucknagel (1972) suit le schéma classique pour l'étude d'une substitution d'amino acide sur une chaîne polypeptidique

Après avoir séparé par chromatographie sur DEAE-Sephadex les 2 protéines, en partant du sérum total, chacune des deux espèces moléculaires furent soumises à la séquence de traitements suivants :

-réduction par beta M E en urée 8 M
- Alkylation
- Hydrolyse trypsique
- Hydrolyse chymotrypsique,
- Hydrolyse par CNBr

Chacun des hydrolysats a subi une séparation par filtration sur gel permettant ainsi d'obtenir plusieurs fractions chromatographiquement distinctes des peptides obtenus.

Chacune de ces fractions a fait l'objet d'un peptide-mapping faisant apparaître pour l'albumine oliphant 2 peptides non présents dans les hydrolysats de l'albumine A.

La fraction contenant les peptides anormaux a été rechromatographiée sur résine échangeuse d'anions et analysée après coloration par la ninhydrine par un système analytique classique.

La comparaison des tracés de l'albumine A et de l'albumine oliphant fait apparaître deux pics anormaux.

Ces deux pics, et leurs homologues provenant de l'albumine A furent rechromatographiés une nouvelle fois sur une résine échangeuse d'ions pour purification.

La composition en aa de ces deux peptides est :

	Alb. A	Alb oliphant	et leur séquence :	
Lys	1	1,9	GLU-GLY-LYS	alb. oliphant
Glu	1	1	GLU-GLY-LYS-LYS	alb. A
Gly	1	1		

Un schéma analogue d'analyse fut appliqué aux hydrolysats chrymotrypsiques, permettant d'isoler un peptide propre à l'albumine oliphant et un autre propre à l'alb. A dont la séquence a été faite, qui montre :

peptide Alb. oliphant Ala-Lys-Glu-Gly-Lys-Lys-Leu

peptide Alb. A Ala-Glu-Glu-Gly-Lys-Lys-Leu

Le peptide chymotrypsique anormal est en parfait accord avec le peptide trypsique anormal et montre que la mutation est une substitution GLU → LYS.

Le même travail fut fait sur l'albumine Ann Arbor aboutissant au même résultat.

o

o o

Ces résultats permettent de faire entrer ces deux variants d'albumine dans la catégorie des mutants ponctuels conduisant au remplacement d'un glutamique par une lysine dans la fréquence de la chaîne polypeptidique.

Comme d'après le code génétique, GLU et LYS sont déterminés par les codons suivants :

GLU	LYS
GAA	AAA
GAG	AAG

la substitution est G → A

Les variants oliphant et Ann Arbor ont une mobilité électrophorétique non seulement identique entre elles mais aussi identique à celle de l'Albumine B de Gitlin et d'un nombre important de variants rapportés provenant de familles non liées entre elles mais originaires de l'Europe du Nord.

De plus, les peptides anormaux détectés par les "peptide-mappings" ont également la même migration et la substitution envisagée par Gitlin était du même type

ASP ⟶ LYS que celle
GLU LYS

mise en évidence par Weitkamp et al. Ces arguments permettent de penser que l'albumine oliphant ou Ann Arbor est structuralement identique à l'albumine B et sans doute à quelques uns au moins des variants lents provenant de l'Europe du Nord.

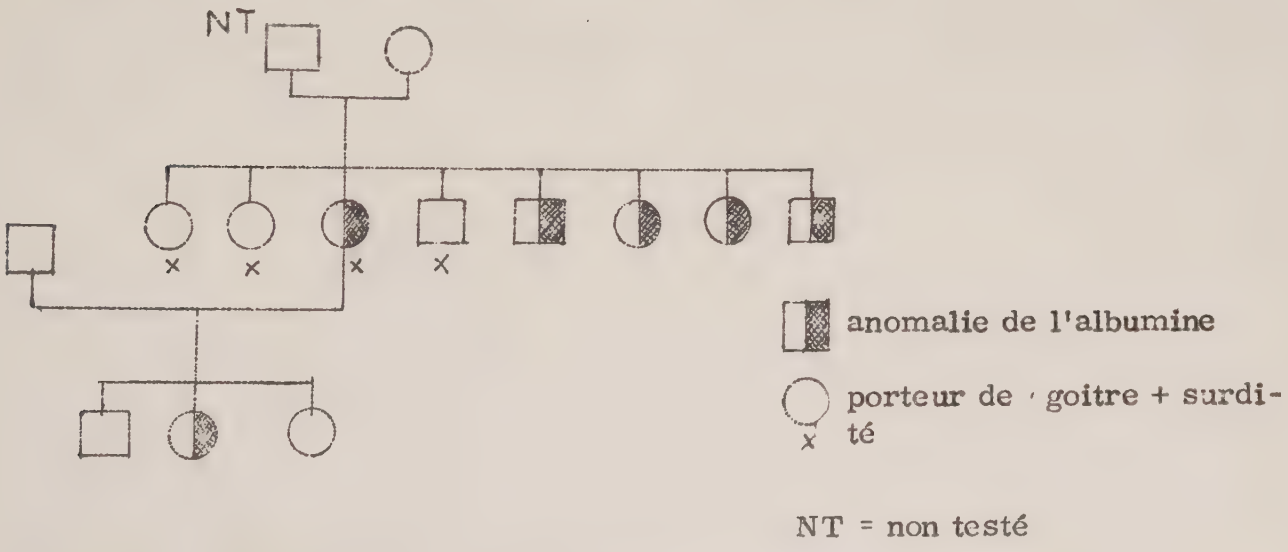
II - DIMERE

A côté de la forme qui porte le nom de bis albuminémie et où la fraction anormale est représentée en même quantité que la forme normale, il existe un deuxième type de variant génétiquement transmis de la sérum-albumine humaine.

Fraser et al. l'a décrite pour la première fois au sein d'une famille dont certains de ses membres étaient porteurs d'une association pathologique goitre + surdité.

L'anomalie électrophorétique consistait en une bande anormale sur gel d'amidon migrant légèrement plus vite que la transferrine.

Cette bande était plus nettement séparée en électrophorèse tridimensionnelle selon la technique de Smithies et Poulik. L'électrophorèse sur papier ne permettait pas de la distinguer de la sérum-albumine normale tandis que l'électrophorèse en gel d'amidon la séparait nettement et montrait une bande d'intensité plus faible que l'albumine normale. L'étude du pédigree de la famille montrait par ailleurs qu'il n'y avait pas de liaison entre la présence de ce variant anormal et le syndrome (goître + surdité).



Pédigree de la famille étudiée par Fraser

Cette anomalie était donc caractérisée, outre le fait que la protéine est en moindre quantité que dans une bis albuminémie, par une mobilité normale sur papier et anormale en gel d'amidon connu pour exercer un effet de molécular-sieving.

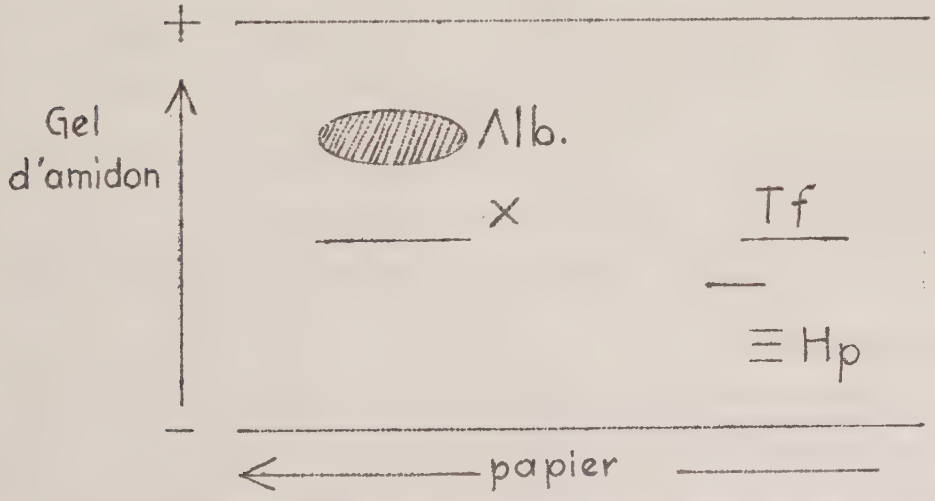
Par cette même méthode, des traces de ce même composant furent retrouvées dans 61 sur 64 sérums normaux étudiés par Poulik et al.

De même Laurell et Nilehn au cours d'examens systématiques retrouvent ce composant dans 5 sérums non génétiquement reliés dans des quantités semblables à celles de l'observation initiale de Fraser.

Dans chacun de ces trois cas le composant isolé avait les mêmes caractéristiques immunologiques que l'albumine normale.

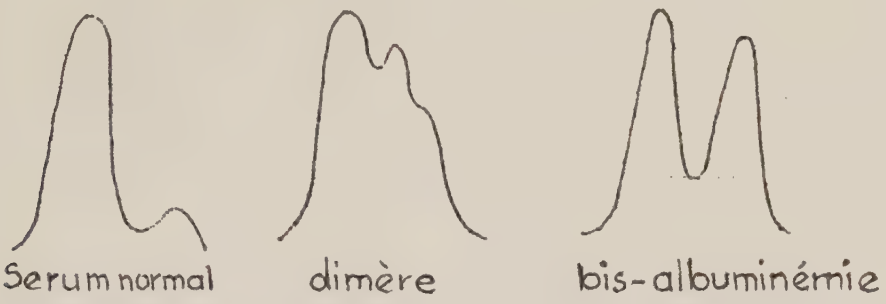
Il s'agit donc d'un composé présent en très faibles quantités dans les sérums normaux mais dont l'intensité peut être anormalement augmentée. Ce caractère se transmet alors génétiquement comme un trait autosomique co-dominant.

Il y a même charge que l'albumine normale et lui est immunologiquement identique mais possède une masse moléculaire différente comme le montre l'électrophorèse en milieu possédant un effet de molécular sieving tel que le gel d'amidon.



x = bande anormale - Tf = transférine - Hp = haptoglobine

Laurell montra que chacune des bandes, qu'elle soit présente en très faible quantité dans le sérum normal, ou qu'elle soit augmentée et que l'anomalie soit alors génétiquement transmise, que cette bande donc, disparaissait après traitement par le beta M.E. ethanol.



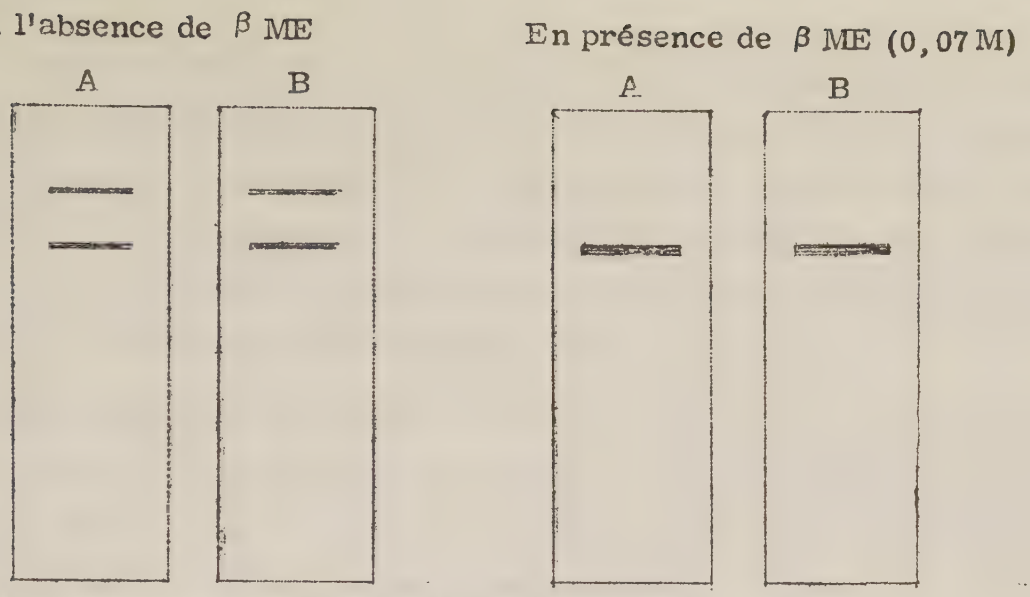
Figures de précipitation en électrophorèse bidimensionnelle croisée alb. anti Alb. d'un sérum normal, d'un dimère, d'une bis-albuminémie en agarose (selon la technique de Laurell).

Les auteurs enrichissent en albumine anormale par chromatographie sur G_{200} qui montre que la bande anormale est de masse moléculaire plus élevée que l'albumine normale. Le fractionnement par le sulfate d'ammonium permet d'obtenir des fractions enrichies en composant anormal parmi les fractions précipitant tôt.

Après incubation de 8 h avec β ME et électrophorèse en milieu contenant du β ME la bande anormale disparaît.

Cela suggère la présence dans le sérum de ces patients d'une mercaptalbumine plus facilement oxydable que la mercaptalbumine normale et qui formerait une plus grande quantité de dimère.

D'autres auteurs (Tamieson et Rhodes) décrivent un cas semblable dans une famille noire américaine, séparent nettement les deux bandes anormales sur gel d'acrylamide et montrent que la migration en gel d'amidon est strictement identique à celle de l'albumine normale après réduction et alkylation des deux composés.



Electrophorèse en gèl de polyacrylamide - urée (8 u)
A - Albumine normale enrichie en polymères par vieillissement,
B - Après séparation de l'albumine du propositus sur bloc d'amidon

Les schémas de sédimentation obtenus sur les fractions enrichies en albumine anormale du propositus par passage en Sephadex (G_{200}) montraient deux fractions de $s_{20,w}$ = 4,45 et 6,35 (ce qui est compatible avec l'hypothèse que le composé le plus lourd est un dimère 6,45 du premier (4,25). Après incubation par le β ME 0,01 M on assiste à une réduction de la fraction lourde au profit de la fraction légère.

Les cartes peptidiques faites sur l'albumine entière ne montrèrent pas de différence entre l'albumine normale et la fraction anormale où l'on dénombrait 34 spots.

Le dosage des groupements SH montre 0,8/mole pour l'albumine normale et 0,6/mole pour le variant

Cette étude montre que le variant envisagé est un dimère d'albumine mais que la dimérisation n'est pas assurée seule par le lien covalent.
Il se pourrait que ce lien ne soit accessible aux réducteurs qu'après dénaturation de la molécule.

Ceci la différencie de celle décrite par Laurell qui était complètement réductible sans dénaturation. L'étude ne permet pas de dire si le variant résulte d'une substitution neutre d'aa ou si le défaut génétique porte sur l'accroissement de la concentration d'un métabolite de faible masse moléculaire liant l'albumine et agissant comme un effecteur allostérique dégageant ainsi le groupe SH pour lui permettre une plus grande réactivité.

Ces trois cas représentent l'ensemble des cas de "dimères" connus avec un probable quatrième décrit comme une bis-albuminémie de type classique sous le nom d'alb.Warao (Arends et all) et qui présentait la caractéristique d'être thermiquement instable.

La question de savoir s'ils représentent les mêmes anomalies génétiques ne sera résolue que par des études structurales plus approfondies mais l'étude génétique de la liaison avec le gène de structure de la Gc protéine que nous allons envisager ultérieurement, apporte une preuve indirecte pour dire que le locus de la bis albuminémie et celui du dimère sont étroitement liés.

o
o o

III - ANALBUMINEMIE

L'absence de quantités décelables en électrophorèse d'albumine fut observée la première fois par Bernhold chez 2 jumeaux allemands. D'autres cas ont été rapportés depuis aux USA et en Suisse.

L'anomalie se transmet comme un caractère autosomique récessif.

L'absence d'albumine n'est pas totale et de faibles quantités de celle-ci peuvent être détectées par des méthodes électrophorétiques fines. Cette albumine présente en faibles quantités n'est pas distinctible immunologiquement de l'albumine normale. La concentration d'albumine chez les hétérozygotes est normale.

Les symptomes de cette anomalie sont très frustes et elle n'est parfois découverte qu'à l'occasion d'un examen systématique. Asthénie et discret oedème prétibial sont les seules manifestations signalées.

La pression colloïdale du sérum est réduite d'un tiers à la moitié de sa valeur normale. L'augmentation de la pression artérielle et une chute de la pression capillaire sont interprétées comme des phénomènes compensatoires. Bien sûr les fonctions de transport sont perturbées et l'on observe une modification dans la cinétique d'élimination du rouge congo et du bleu Evans.

Une chute de la calcémie n'est qu'occasionnellement observée.

La demi-vie augmentée de l'albumine injectée IV à ces patients confirme que l'origine de cette anomalie comme est une diminution de la synthèse et non pas une augmentation de sa destruction. Ceci pose le problème de la régulation de la synthèse des protéines chez les eucaryotes et de l'existence chez ces organismes de gènes régulateurs semblables à ceux connus dans les bactéries.

IV - IMPLICATIONS GENETIQUES - LIAISON ENTRE LE GENE DE STRUCTURE DE L'ALB. ET CELUI DE LA PROTEINE GC

L'un des résultats important, au plan biologique, de l'étude de ce marqueur génétique qu'est la caractère bis albuminémique fut de montrer qu'il existait une liaison étroite entre le locus de l'albumine et le locus de la protéine Gc (Weitkamp et al).

Le travail comportait l'étude de trois familles différentes, 2 porteuses d'un variant appartenant au type albumine B, et une porteuse d'un variant rapide identifié à l'Alb. Naskapi. A côté de la déterminatinn du phénotype Gc qui peut être, comme pour l'haptoglobine 1-1, 2-2 ou 2-1, les individus furent typés pour les caractères suivants :

- haptoglobine MNS

- transferrine P
- phosphatase acide Kell
- phosphoglucomutase (PGM) Duffy
- ABO Kidd
- Rh Lewis
- Secretor

Les phénotypes pour les 3 propositus étaient les suivants :

1	Alb. "Ann Arbor"	Gc 2-1
3	Alb "Oliphant"	Gc 2-2
2	Alb "Larson"	Gc 1-1

Le rapport de ségrégation pour les familles 1 et 3 était de 39 avec le caractère et 38 sans. Sur le total de 43 personnes porteuses d'un mutant 18 étaient des hommes et 25 des femmes. Parmi les 39 sujets testés 38 reçurent les gènes pour le variant albumine et Gc 2 ou les gènes pour l'albumine normale et Gc 1 du parent porteur. On a trouvé un recombinant chez lequel l'illégitimité n'a pu être montrée dans aucun des systèmes génétiques testés. De l'étude des familles 1 et 3, il apparaît qu'il existe une liaison entre le locus de l'albumine et celui de la protéine Gc . Dans la famille 2, le gène du variant rapide se grège chez les individus 1-1.

Aucun des autres marqueurs génétiques n'est lié au locus de l'Albumine variant.

La distance entre les deux loci a été estimée à 2,3 centimogar (Weitkamp 1970). Bien que cette distance soit encore grande à l'échelon moléculaire cette liaison soulève la possibilité que les loci dérivent phylogénétiquement l'un et l'autre d'un même locus par duplication génique. Cette hypothèse a reçu un début de confirmation grâce au travail de Bowmann et Kearn) qui ont purifié la protéine Gc, ont montré qu'elle était constituée de deux sous unités très voisines et que la séquence C terminale d'une des sousunités était :

LEU-SER-VAL comme celle de l'albumine.

Une étude semblable a été faite sur l'albumine Naskapi (Kaarsalo) et sur l'albumine Gainesville (Lau.) qui donne des résultats identiques.

Elle a été menée également sur le dimère génétiquement transmis, et Weitkamp a montré que celui-ci était aussi lié au locus Gc et que la distance était identique. Il en résulte que vraisemblablement ces deux formes d'anomalies génétiques sont gouvernées par un même gène et qu'il doit être le gène de structure de la sérum-albumine.

oOo

CONCLUSION

Ainsi les différents gènes régissant le caractère bis albuminémie sont probablement allèles du gène de structure de la sérum-albumine, qu'il s'agisse d'un des quinze variants déterminant une bis albuminémie vraie ou qu'il s'agisse de la variété donnant lieu à la dimérisation de la molécule. Ces mutations réalisent dans la chaîne polypeptidique, une substitution d'amino acide qui en modifie la structure et les propriétés.

Reste la question de la mutation régissant le caractère "an-albuminémie", celle-ci affecte non pas la structure et/ou les propriétés mais la synthèse de la chaîne polypeptidiquecomme dans le cas des thalassémies pour l'Hb.

Tout en ne méconnaissant pas toutes les difficultés que soulèvent la régulation de la synthèse des protéines chez les eucayotes, on ne peut s'empêcher de désirer savoir si ce gène aussi est lié au gène de structure de la protéine Gc et par là à celui de la Sérum-Albumine elle même, et, ainsi d'avoir des renseignements sur l'organisation du génome humain.

oOo

Vu, le Président de Thèse :

Professeur ROSA

Vu, le Doyen de la Faculté :

Professeur CASTAIGNE

Vu et Permis d'Imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET

BIBLIOGRAPHIE

AOKI et FOSTER

J. Am. Chem. Soc. 79, 3385, 1957

BEARN et CLEAVE

In Metab. Basis of inherited deseases
Stanbury p. 1315

BENNHOLD

Verhdl Deutsch Gossellsch inn. Med. 1954
60 - 630

BENESCH et BENESCH

Fed Proc. 15, 218, 1956

EFREMOV

Science 153, p. 1664

FOSTER et SOGAMI

Jour. Bio. Chem. 237, n° 8, 1962

FOSTER in PUTNAM

"The plasma proteins" vol. I Academic Press. 1960, NY.

FRASER et al

Lancet 16 May 1959

GITLIN

J. Clin Invest 1961

HUGUES

Jour. Am. Chem. Soc. 79, 1836, 1957.

KAI O. PEDERSEN

Arch. Biophys. Biochem. 10, 24, p. 4479

KAARSALO

Science 158, p. 123

LARS OLOV ANDERSON

Biophys. Biochem Acta 117. 115-133, 1966

LAU et al

Nature 221, 4 janv. 1969

LEVIN et al

New Engl. J. Med. 275, 1115, 1966

LIE INJO et al.

Human heredity 1972

LUETSCHER

J. Am. Chem. Soc. 61, 2888, 1939

LUZZATTI, WITZ, NICOLAIEFF

J. Mol. Biol.

MELARTIN et BLUMBERG

Science 153, p. 1664

MOORE et FOSTER

Biochemistry p. 3409, 1968

NIKKEL - FOSTER

Biochem 10 , 24, p. 4479

PETERS

Jour Biol. Chem. 242, n° 7, 1967

POULIK et al.

Nature 188 ; p. 506 ; 1960

SMITHIES et POULIK

Nature vol. 177, 1956

SOGAMI, PETERSEN, FOSTER

Biochemostry p. 3409, 1968

TARNOKY et LESTAS

C. C. A. 9, p. 551 (1964)

TRITSCH et TRITSCH

Jour. Biol. Chem. 238, n° 1, 1963

WEBER et YOUNG

J. Biol. Chem. 239, n° 5, 1964

WEITKAMP et al

Human heredity 19, p. 159, (1969)

WEITKAMP et al.

Biochemistry vol. 11, n° 5, p. 883, 1972

WEITKAMP et al.

Am. Jour. Hum. Gen. vol. 18, n° 6, 1966

WONG et FOSTER

Biochemistry p. 4104 vol. 2 n° 6

YOUNG et FOSTER

J. Am. Chem. Soc. 76, 1588, 1954.

oOo